

BULLETIN

DU

DÉPARTEMENT DE L'AGRICULTURE

AUX

INDES NÉERLANDAISES.

N^o. IV.

(MICRO-BIOLOGIE II)

BUITENZORG

IMPRIMERIE DU DÉPARTEMENT

1906.

SOMMAIRE

1. Quelques recherches sur la composition de l'eau et sur les diastases du fruit de *Cocos nucifera*.
 2. Sur une bactérie aérobie fixant l'azote libre de l'atmosphère : *Bacterium Krakatau*.
-

Quelques recherches sur la composition de l'eau et sur les diastases du fruit de *COCOS NUCIFERA*.

par

E. DE KRUYFF.

TECHNOLOGUE.

Pour essayer de trouver pour l'eau de Coco un emploi industriel, effort qui, je le dis d'avance, n'a pas eu de résultats, j'ai fait sur la composition de cette eau des recherches dont voici le résumé :

Les noix de Coco jeunes contiennent en quantité variable un liquide clair, de goût sucré. A mesure que le fruit vieillit, ce liquide se trouble de plus en plus (Ce trouble est causé par des restes de cellules et de petites gouttelettes d'huile) le goût sucré diminue et le liquide devient mousseux. L'analyse des gaz dégagés montre qu'ils contiennent une quantité considérable d'acide carbonique mélangée à des traces d'air.

L'analyse quantitative donne les chiffres exposés dans le tableau I.

Tableau I.

Analyse quantitative des gaz dissouts dans l'eau de la noix de Coco.

	Quantité de gaz dans 100 c.c. d'eau T 27	Acide car- bonique en % de gaz total	Oxygène en c.c.	Azote en c.c.
Noix jeune	0,5	98%	—	—
Noix mûre	24,0	98%	0,2	0,3

Pour l'analyse qualitative et quantitative des sucres, j'ai employé la méthode suivante :

L'examen de l'eau au polarimètre donnait une déviation à gauche ; il résulte de cela que la présence de sucre interverti ou de lévulose était plus que probable. Pour démontrer la présence de ces sucres et en même temps pour les éliminer et faciliter ainsi l'analyse d'autres sucres, dont la présence n'était pas impossible, j'ensemenciai l'eau avec une petite quantité d'une culture pure d'un *Saccharomyces*. Comme ce *Saccharomyces* ne pouvait faire fermenter que le glucose et le lévulose, la présence de ces sucres ou de l'un des deux était démontrée si l'eau venait à fermenter.

Avec l'eau examinée, la fermentation ne tarda pas à se produire et après 72 heures elle était terminée. Après filtration, cette eau fut examinée de nouveau au polarimètre et elle donna alors une déviation à droite. Des analyses d'eau de fruits plus ou moins âgés montrèrent que l'eau de très jeunes fruits ne donnait pas la moindre fermentation. Pour expliquer cette anomalie, on pouvait donner les deux explications suivantes : ou bien l'eau ne contient ni l'un ni l'autre de ces sucres, ou bien elle les renferme, mais non les matières albuminoïdes nécessaires au développement du *Saccharomyces*.

Laquelle de ces deux suppositions était la vraie? C'est ce que nous apprennent les expériences suivantes. A deux flacons d'Erlermeyer contenant de l'eau qui ne fermentait pas, j'ai ajouté au premier du glucose et au deuxième de la peptone. Après 24 heures le flacon auquel fut ajouté du glucose était en fermentation active, tandis que l'autre ne montrait pas le moindre développement du *Saccharomyces*. L'eau des noix jeunes contient donc les matières albuminoïdes nécessaires à la croissance du *Saccharomyces*, mais, au contraire

des noix plus âgées, elle ne contient ni sucre interverti, ni lévulose.

L'eau des noix plus âgées après la fermentation donne aussi bien que celle des noix très jeunes, une déviation à droite au polarimètre; la déviation de l'eau fermentée est bien moindre que celle de l'eau des noix jeunes. Il était donc nécessaire de faire des recherches sur la présence de saccharose. Si ce sucre était présent, un peu de sucrase devait donner une inversion, après laquelle il serait possible de faire fermenter le liquide. A deux flacons, contenant respectivement de l'eau d'une noix jeune et de l'eau d'une noix plus âgée après fermentation, fut additionné un peu d'une solution de sucrase (de Merck) et après quelques jours le liquide futensemencé de *Saccharomyces*. Le jour suivant les deux flacons montrèrent une fermentation active. Il résulte de ces expériences que l'eau, dans les deux cas, contenait du saccharose. La fermentation étant terminée, les liquides furent filtrés et polarisés de nouveau. Avec aucun des liquides le polarimètre ne donna la moindre déviation.

Nous en concluons donc que :

l'eau du fruit jeune ne contient en fait de sucres actifs que le saccharose et que pendant la maturation ce sucre est interverti en glucose et en lévulose.

La quantité de ces sucres est très minime, comme le montre le tableau II, où sont exposés les chiffres obtenus en polarisant l'eau de noix de diverses provenances et d'âges variés, avant et après l'inversion par l'acide chlorhydrique.

Comme le montrent ces chiffres, la quantité de sucres est trop petite pour rendre possible l'emploi de ce liquide dans l'industrie, même en tenant compte des quantités énormes de cette eau que l'on pourrait utiliser, et

qui, pour les fabricants de copra *, n'ont pas la moindre valeur.

Tableau II.

No. de l' Analyse	Polarisation en degrés Tube de 200 mM.	Polarisation en degrés après l'inversion.	Quantité de saccharose en %	Quantité de sucre interverti en %
no. 1.	+ 2,2	— 0,5	1,5 %	0,0 %
no. 2.	— 0,4	— 0,96	0,3 %	1,6 %
no. 3.	— 0,7	— 0,7	0,0 %	1,9 %
no. 4.	+ 0,0	— 0,44	0,3 %	0,9 %
no. 5.	+ 0,7	— 0,3	0,6 %	0,3 %
no. 6.	+ 1,4	— 0,66	1,2 %	0,4 %

Examinons maintenant de quelle manière se fait l'inversion du saccharose pendant la croissance et la maturation du fruit.

Cette inversion peut se faire d'une des manières suivantes :

1. Au moyen des acides que renferme l'eau de Coco.
2. Par des diastases sécrétées par l'action de micro-organismes.
3. Par des diastases sécrétées par les cellules de la noix.

L'eau de Coco a une réaction acide : 100 c.c. d'eau sont neutralisés par 5 c.c. $\frac{1}{10}$ N. Na-OH. Cette acidité ne suffirait qu'à provoquer une inversion extrêmement faible qui prendrait un temps énorme.

*) Le copra est l'albumen du fruit, coupé en morceaux et séché.

Comme le montre l'expérience No. 1 du tableau III, l'inversion de l'eau de coco se fait rapidement; aussi, on ne saurait l'attribuer à la faible proportion d'acide. L'inversion doit donc avoir lieu d'une autre manière. Comment l'expliquer? C'est ce que nous apprend l'expérience No. 1 du tableau IV: une solution de saccharose futensemencée d'une petite quantité de l'eau d'un fruit pas très jeune. Pour une inversion dans un temps si court, l'acide est en trop petite quantité pour intervertir le saccharose et pourtant, comme les chiffres le montrent, il se produit une inversion importante.

Tableau III.

	Date de la polarisation.	Polarisation en degrés. Tube de 200 m.M.
Eau d'un fruit pas très jeune avec quelques gouttes de CH Cl_3 .	20 Mai	+ 1,4
	30 Mai	— 0,6
Eau de la même noix mais chauffée jusqu'à 100°C avec quelques gouttes de CH Cl_3	20 Mai	+ 1,4.
	30 Mai	+ 1,4

Restent donc les suppositions 2 et 3.

L'inversion du saccharose n'est pas causée par de la sucrase sécrétée par l'action de micro-organismes, c'est ce que nous apprend l'expérience No. 1 du tableau III où l'addition de chloroforme n'empêche pas l'inversion. Les expériences 1 et 2 du tableau IV prouvent cela de façon encore plus certaine :

Dans l'expérience précédente, il se pouvait que la quantité de sucrase sécrétée par les micro-organismes avant qu'ils aient été tués par l'addition de chloroforme fût suffisante pour intervertir le saccharose. Si dans les

deux expériences du tableau IV cette sécrétion a déjà eu lieu, la sucrase sera si diluée qu'elle ne pourra pas donner l'inversion. Enfin l'examen microscopique démontre l'absence de ces micro-organismes.

Des trois suppositions il ne reste donc que la troisième: l'inversion par une diastase sécrétée par les cellules du fruit.

Et les expériences des tableau III et IV prouvent que cette supposition est la seule plausible: l'expérience No. 2 du tableau III, où la diastase est détruite par la chaleur, et l'expérience No. 1 du tableau IV, où une très petite quantité du liquide contenant de la diastase suffit à intervertir une solution de saccharose, sont concluantes à cette égard.

Tableau IV.

	Date de polarisation.	Polarisation en degrés.
1. Solution de saccharoseensemencée d'une petite quantité d'eau de Coco avec un peu de chloroforme.	14 Mai	+ 2,8°
	20 Mai	+ 0,7°
	27 Mai	— 1,4°
2. Eau de Coco d'un fruit très jeuneensemencée d'une petite quantité d'eau d'un fruit plus âgé avec un peu de chloroforme.	14 Mai	+ 2,2°
	20 Mai	+ 0,8°
3. Solution de saccharoseensemencée d'une petite quantité d'eau de Coco de fruit très jeune avec un peu de chloroforme.	14 Mai	+ 2,8°
	27 Mai	+ 2,8°

L'expérience No. 3 du tableau IV montre que l'eau

d'une noix très jeune ne contient pas encore de la sucrase. Donc :

L'inversion du saccharose présent dans l'eau de Coco se fait par l'action d'une diastase sécrétée par les cellules de la noix.

Cette inversion n'a pour but que de fournir à l'embryon pendant les premiers temps de son existence des hydrates de carbone assimilables. La possibilité n'était donc pas exclue que, soit dans l'eau, soit dans les cellules de la noix, se trouveraient dissoutes d'autres diastases, qui pourraient rendre solubles, avant le commencement de la croissance, les matières nutritives nécessaires à l'embryon.

Les expériences montrent que ces diastases, à l'exception de la *catalase* et de l'*oxydase*, sont absentes, aussi bien de l'eau de la noix que des cellules. Ces deux diastases catalase et oxydase se trouvent non seulement dans l'eau des noix plus âgées, mais aussi dans l'eau de noix très jeunes.

Les autres diastases ne se trouvant, ni dans l'eau du fruit, ni dans les cellules de l'albumen, la dissolution de ces réserves nutritives n'aura lieu que sous l'influence des diastases sécrétées par les cellules du haustorium.

Pour faire l'analyse de ces diastases, ce dernier fut broyé avec de l'eau. Le haustorium employé à ces recherches, avait une réaction acide très prononcée et remplissait toute la cavité du fruit.

La démonstration des diastases se faisait en observant, si le haustorium broyé était capable de dissoudre les matières insolubles et de les transformer en des combinaisons susceptibles de servir à la nourriture de l'embryon.

L'analyse porta sur les diastases suivantes : la lipase, la diastase protéolique, la sucrase, l'amylase, la catalase la tyrosinase, l'oxydase. La présence fut démontrée de

la lipase, de la diastase protéolique, de la catalase, de l'amylase et de la peroxydase. Vu que les membranes des cellules disparaissent, il est certain que les diastases qui les décomposent, sont présentes, mais il me fut impossible de démontrer leur existence.

Résumé des résultats obtenus :

1. L'eau de la noix de Coco contient du saccharose. Ce sucre est interverti pendant la maturation de la noix.

2. Cette inversion se fait par l'action de la diastase sucrase, que est dissoute dans l'eau du fruit.

3. Cette diastase est sécrétée par les cellules de l'albumen.

4. A part la sucrase, l'eau contient encore les diastases suivantes: l'*oxydase* ¹⁾ et la *catalase*.

5. De ces trois diastases l'eau de fruit très jeune ne contient que l'*oxydase* et la *catalase*.

6. Le haustorium contient e.a. dans ses cellules: la *lipase*, la *diastase protéolique*, l'*amylase*, la *catalase* et la *peroxydase*.

Buitenzorg, Juin 1906.

E. DE KRUIJFF.

¹⁾ Voy. HUNGER: Die Oxydasen und Peroxydasen in der Cocosmilch. (Bulletin de l'Institut botanique de Buitenzorg no. VIII).

Sur une bactérie aérobe, fixant l'azote libre de l'atmosphère : *Bacterium Krakatauï*.

par

E. DE KRUIJFF.

Grâce à l'obligeance de M. le Prof. Dr. A. Ernst, qui faisait partie de la dernière excursion à l'île de Krakatau, j'ai eu l'occasion de faire quelques recherches sur la flore microbienne de cette île.

Ces recherches sur une flore microbienne qui ne date que de vingt-trois ans, ont donné des résultats très intéressants à divers points de vue. Malheureusement les échantillons, qui me furent remis, n'étaient pas assez nombreux pour me permettre de généraliser les résultats obtenus et d'en tirer des conclusions.

C'est pour cela que je ne donnerai dans cette courte notice que la description d'une bactérie ayant le pouvoir de fixer l'azote libre de l'atmosphère. J'espère avoir un jour l'occasion de visiter moi-même cette île, et de récolter alors les échantillons nécessaires; les résultats de cette nouvelle étude seront publiés ultérieurement.

Bacterium Krakatauï fut isolé au moyen de cultures électives, faites à partir 1° d'échantillons de pierre ponce en divers états d'érosion (sur ces pierres ou sur ce sable la végétation manquait tout à fait ou était très peu développée) et 2° d'un échantillon d'humus de la forêt.

J'ai employé pour ces cultures électives un liquide

nutritif de la même composition que celui utilisé par Beyerinck pour isoler l'*Azotobacter chroococcum*. A partir de ces cultures-mères, j'aiensemencé de nouveau les organismes dans des liquides de composition identique, et après croissance suffisante, j'ai fait des cultures sur de plaques de gélose-mannite.

A l'examen microscopique, ces cultures se montrèrent presque pures et formées de colonies transparentes. Celles-ci furent ensemencées de nouveau dans le liquide nutritif. Dans quelques-uns de ces liquides la mannite était remplacée par le glucose.

Comme la fixation de l'azote se faisait bien mieux lorsque j'ajoutais au liquide nutritif un peu d'une combinaison d'azote, j'additionnai *toujours* à ces liquides un peu de terre stérilisée.

La culture se faisait à la température du laboratoire, c'est-à-dire à 26-28 degrés C. Après un temps de culture variable, les Erlenmeyers furent analysés et la quantité d'azote dans le liquide fut déterminée suivant la méthode de Kjehldal.

Les résultats obtenus dans ces analyses sont indiqués dans les tableaux suivants.

Tableau No. I.

Composition des liquides nutritifs

EAU 200 gr.
MANNITE. 4 —
 $K_2 H PO_4$ 0,1 —
SELS INORG. traces.
TERRE STÉRILISÉE 0,1 —

No. de l'analyse.	DATE.	Nombre de jours.	Azote total en c.c. 1/10 N.	Analyse témoin.	Azote dans 0,1 gr. de terre stérilisée.	Quantité d'Azote fixée en c.c. 1/10 N.	Azote fixée en m.G.	Quantité d'Azote en m.G. pour 1 gr. de sucre.	Observations.
1	10 Juillet—14 Sept.	64	4,2	0,4	0,35	3,45	4,9	1,2	
2	10 Juin—5 Sept.	85	7,4	0,4	0,35	6,65	9,3	2,3	
3	24 Juillet—14 Sept.	50	4,85	0,4	0,35	4,1	5,7	1,4	
4	10 Juin—14 Sept.	94	5,9	0,4	0,35	5,15	7,2	1,8	Dans le liquide se trouvait un peu de Penicillium.
5	— dito —	94	4,7	0,4	0,35	3,95	5,6	1,4	
6	10 Juin — 5 Sept.	85	4,8	0,4	0,35	4,05	5,7	1,4	
7	— dito —	85	5,2	0,4	0,35	4,45	6,4	1,6	
8	10 Juillet—14 Sept.	64	4,3	0,4	0,35	3,55	5,0	1,3	
9	— dito —	64	5,2	0,4	0,35	4,45	6,4	1,6	
10	24 Juillet-14 Sept.	50	3,7	0,4	0,35	2,95	4,1	1,0	
11	3 Août—14 Sept.	41	3,2	0,4	0,35	2,45	3,6	0,9	
12	24 Août—14 Oct.	50	4,3	0,4	0,35	3,55	5,0	1,3	

Tableau No. II.

Composition des liquides nutritifs

EAU	500
MANNITE	5
$K_2 H PO_4$	0,25
SELS INORG.	traces.
TERRE STÉRILISÉE	0,1

No. de l'analyse.	DATE.	Nombre de jours.	Azote total en c.c. 1/10 N.	Analyse témoin.	Azote dans 0,1 gr. de terre stérilisée.	quantité d'Azote fixée en c.c. 1/10 N.	Azote fixé en m. G.	quantité d'Azote en m. G. pour 1 gr. de sucre.	Observations.
13	19 Mai—14 Sept.	115	8,8	0,9	0,35	7,55	10,6	2,1	
14	— dito —	115	7,4	0,9	0,35	6,15	8,6	1,7	
15	— dito —	115	10,7	0,9	0,35	9,45	13,2	2,6	Le liquide s'est un peu coloré.

Tableau No. III.

Composition des liquides nutritifs

EAU	200
GLUCOSE	4
$K_2 H PO_4$	0,1
SELS INORG.	traces.
TERRE STÉRILISÉE	0,1
$Ca CO_3$	—

No. de l'analyse.	DATE.	Nombre de jours.	Azote total en c.c. 1/10 N.	Analyse témoin.	Azote dans la terre stérilisée.	quantité d'Azote fixée en c.c. 1/10 N.	Azote fixé en m. G.	quantité d'Azote en m. G. pour 1 gr. de sucre.	Observations.
16	7 Août—14 Oct.	67	5,05	0,4	0,35	4,3	6,0	1,5	
17	— dito —	67	4,3	0,4	0,35	3,55	5,0	1,3	
18	— dito —	67	3,6	0,4	0,35	2,85	4,0	1,0	
19	7 Sept. 14 Oct.	37	3,3	0,4	0,35	2,55	3,6	0,9	Le réaction du glucose a disparu en 12 jours.

Ces tableaux montrent que, dans la solution nutritive de 1% de mannite, la quantité maxima d'azote fixée est de 2,6 m. G. pour 1000 m. G. de sucre fermenté. (Analyse No. 15 du tableau No. II.) tandis qu'avec le glucose cette quantité est bien moins élevée: au maximum 1,5 m. G. d'azote fixé pour 1000 m. G. de sucre fermenté. (Analyse No. 16 du tableau No. III).

Sur les cultures, même sur les plus âgées, il ne se forme jamais de voile: le liquide est troublé de façon uniforme dans toute sa masse et devient de plus en plus visqueux. Dans le No. 4 seulement, la culture étant âgée de 94 jours, le liquide se colora un peu en brun.

Description de Bacterium Krakatauï.

Bacterium Krakatauï forme sur la gélose-mannite des colonies visqueuses et transparentes qui, en vieillissant, se troublent et deviennent opaques. *Il croît bien également sur la gélose de viande et dans le bouillon où il se développe beaucoup mieux même que l'Azotobacter chroococcum par exemple.* Les colonies sur la gélose de viande sont opaques et se colorent très légèrement en jaune. La bactérie sécrète de la trypsine et ne dénitrifie pas. Elle ne sécrète pas d'amylase et peut oxyder les sels comme les propionates, les butyrates, etc.

L'addition de faibles quantités d'une combinaison azotée quelconque, active beaucoup la fixation de l'azote. Bâtonnets immobiles, longs de 0,8-1,2^u et larges de 0,3.^u Des spores ne sont pas formées.

E. DE KRUIJFF,

Nov. 1906.
